پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره نوزدهم شماره ۷۰ خرداد و تیر سال ۱۳۸۸ (۵۳-۴۹)

بررسی میزان شیوع جهش δ32 در ژن CCR5 بیماران مبتلا به سرطان پستان شهرستان رفسنجان

محمد کاظمی عرب آبادی[۱] محمد رضا میرزایی[۲] ابراهیم رضازاده زرندی[۳]
غلامحسین حسن شاهی[۴] محمدرضا وطنی باف[۵]

چکیده

سابقه و هدف : بسیاری از سرطان‌ها یک شبکه قوی از کموکین‌ها و گیرنده‌های آنها از جمله کموکین‌های CCL3 (MIP-1α)، CCL4 (MIP-1β) و CCL5 (RANTES) را بیان می‌کنند. این کموکین‌ها اعمال خود را از طریق گیرنده‌های CCR2 و CCR5 انجام می‌دهند. به دلیل اهمیت CCR5 در تومورها بررسی نقش این گیرنده در تومورها مهم به نظر می‌رسد. مطالعات نشان می‌دهد که نوعی جهش با نام جهش 32 δ در ژن CCR5 می‌تواند منجر به کاهش بیان و عملکرد این گیرنده شود. ما در این مطالعه به بررسی جهش شناخته شده 32 δ و متعاقب آن حذف ۳۲ نوکلئوتیدی از این ژن در بیماران مبتلا به سرطان پستان پرداختیم.

مواد و روش ها : این مطالعه طی ماه‌های بهمن سال ۱۳۸۶ تا خرداد ۱۳۸۷ روی ۳۶ بیمار با سرطان پستان و ۱۰۰ نمونه کنترل و با کمک تکنیک Gap-PCR انجام شد. اطلاعات مربوط به سن، شغل و طبقه اجتماعی از طریق پرسش‌نامه و بررسی‌های آماری با کمک آزمون‌های T و کای- دو انجام شد.

یافته ها : بررسی‌ها در این جمعیت نشان داد که هیچکدام از بیماران مورد مطالعه دارای جهش 32 δ-CCR5 نبودند. نتایج ما همچنین نشان داد که ۳ نفر از ۱۰۰ نفر (۳ درصد) گروه کنترل دارای فرم هتروزیگوت این جهش بودند.

استنتاج : مطالعه ما نشان داد که جهش 32 δ-CCR5 در بیماران مورد مطالعه مشاهده نشد. بنابراین به نظر می‌رسد که شاید این جهش در سرطان پستان نقشی نداشته باشد.

واژه‌های کلیدی: کموکین‌ها، CCR5، جهش 32 δ ، سرطان پستان

مقدمه

بسیاری از سرطان‌ها یک شبکه قوی از کموکین‌ها و گیرنده‌های آنها را بیان می‌کنند(۱). مطالعات روی مدل‌های حیوانی و انسانی نشان می‌دهد که اعمال این دسته مولکول‌ها، در تومور متفاوت است که می‌توان از

مولف مسئول: محمد کاظمی عرب آبادی- رفسنجان: میدان انقلاب، دانشکده پزشکی،گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی E-mail: kazemi24@yahoo.com
۱. دکترای ایمونولوژی، استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان ۲. دکترای ژنتیک، استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
۳. کارشناسی ارشدمیکروبیولوژی، مربی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان ۴. دکترای هماتولوژی، استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
۵. متخصص پاتولوژی، استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
تاریخ دریافت : ۸۷/۶/۳ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۸۷/۷/۲۴ تاریخ تصویب : ۸۸/۲/۲۶

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]

www.SID.ir

به این موارد اشاره کرد: بسیج سلول‌های ایمنی از جمله ماکروفاژها، سلول‌های T تنظیم کننده (regulatory lymphocyte T)، سلول‌های NK cell و لنفوسیت‌های T عملکردی به محل تومور(۲)، تحریک سلول‌های ایمنی موجود در محل تومور برای ترشح مدیاتورهای خود از جمله سایتوکین‌های آنژیوژنز و آنژیواستاتیز(۳)، تنظیم پاسخ‌های ضد توموری، نقش مستقیم و غیرمستقیم به‌عنوان فاکتور رشد و زندگی برای سلول‌های تومور و استرومای تومور(۱)،کمک به اعمالی مثل متاستاز(۴) و بسیاری از اعمال دیگر(۱). از جمله کموکین‌های مهم که محققین زیادی به خواص ضد توموری آنها و همچنین نقش آنها در متاستاز ریز محیط تومور پی برده‌اند، کموکین‌های CCL3(MIP-1α)، CCL4(MIP-1β) و CCL5 (RANTES) می‌باشند(۵). این کموکین‌ها اعمال خود را از طریق گیرنده‌های CCR2 و CCR5 انجام می دهند(۵،۶). مطالعات نشان می‌دهد که سیگنال‌های ناشی از CCR5 منجر به افزایش رونویسی و ترجمه از ژن p53 می‌شود(۵). P53 پروتئینی با خواص ضد توموری است که در بسیاری از موارد، نقص در بیان و عملکرد این پروتئین منجر به ایجاد سرطان در بافتی خاص از جمله بافت پستان می‌شود(۵). بنابراین به نظر می‌رسد که هر گونه نقصی در پروتئین CCR5 و مولکول‌های درگیر در سیگنالینگ داخل سلولی این گیرنده می‌تواند منجر به ایجاد و یا وخیمتر شدن سرطان پستان شود. مطالعات گذشته نشان می‌دهد که یک جهش در تنها اگزون ژن CCR5 و متعاقب آن حذف ۳۲ نوکلئوتید (δ 32) از این ناحیه منجر به بیان کاهش یافته و غیر عملکردی این مولکول بر سطح سلول‌های این افراد می‌شود(۱۰-۷). به گونه‌ای که این جهش به صورت پلی مرفیسم در برخی جوامع در آمده است(۹). با توجه به اینکه سرطان پستان شایعترین فرم بدخیمی در زنان محسوب می‌شود(۱۱)، به نظر می‌رسد بررسی مکانیسم‌های متعدد موثر بر این بیماری با اهمیت باشد. بنابراین با توجه به توضیحات ارائه شده در مورد نقش سیستم ایمنی در مبارزه علیه سرطان‌ها و همچنین نقش جهش δ 32 در نقص عملکرد CCR5 به عنوان گیرنده کموکینی موثر در پاسخ‌های ایمنی، این مطالعه طراحی شد تا به بررسی وجود جهش δ 32 در بیماران با سرطان پستان بپردازیم.

مواد و روش ها

نحوه انتخاب بیماران:

این مطالعه طی ماه‌های بهمن سال ۱۳۸۶ تا خرداد ۱۳۸۷ روی ۳۶ بیمار زن مبتلا به سرطان پستان (تمامی بیماران مراجعه کننده به بیمارستان علی ابن ابیطالب (ع) شهرستان رفسنجان) و ۱۰۰ نمونه کنترل (۳ برابر گروه مورد) به انجام رسید. به این ترتیب که با مراجعه به پرونده بیماران، با آنها جهت اهدا خون محیطی هماهنگی به‌عمل آمد. افراد مورد بررسی بیماران زن مبتلا به سرطان پستان بودند که توسط یک پاتولوژیست بیماری آنها از روی نمونه رنگ‌آمیزی شده با تکنیک H & E مشخص شده بود. بیماری اندازه تومور و میزان متاستاز آن درجه بندی شد به این ترتیب که درجه ۱ و درجه ۲ بیماران با تومور کمتر از ۲ سانتیمتر و عدم درگیری غدد لنفاوی به عنوان درجه ۱، تومور بزرگتر از ۲ سانتیمتر و درگیری غدد لنفاوی به عنوان درجه ۲ و تومور بزرگتر از ۲ سانتیمتر و درگیری غدد انفاوی به همراه درگیری عضلات و متاستاز به نقاط دوردست نیز به عنوان درجه ۳ در نظر گرفته شدند. براساس این درجه بندی، تومور ۱۱ نفر از بیماران درجه ۲، ۶ نفر درجه ۱ و ۱۹ نفر باقی مانده درجه ۲ بود. گروه کنترل را خانم‌هایی تشکیل می‌دادند که از نظر سن، شغل و طبقه اجتماعی با گروه موردمطالعه یکسان‌سازی شده بودند. دوگروه به گونه‌ای انتخاب شدندکه عوامل مخدوش‌کننده به‌طورکامل حذف شوند، مثلا دو گروه عاری از تمام بیماری‌های عفونی و آلرژی بودند و سیگار نمی‌کشیدند. مطالعه پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان به انجام رسید و نمونه‌گیری نیز با تفهیم کامل مبنی بر تحقیقاتی بودن مطالعه و با اخذ رضایت کتبی از افراد انجام شد.

Archive of SID

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]

www.SID.ir

استخراج DNA:

نمونه مورد بررسی در این بیماران و گروه کنترل، خون محیطی بود که در ضد انعقاد EDTA جمع‌آوری شده بود. DNA ژنومی افراد مورد بررسی از نمونه‌های خون محیطی و توسط کیت‌های استخراج DNA که از شرکت Bioneer ساخت کشور انگلستان تهیه شده بود، مطابق با دستورالعمل کیت، استخراج و در ویال‌های جداگانه تقسیم‌بندی شد و در دمای $-20^{o}c$ تا زمان انجام آزمایشات PCR نگهداری شد.

واکنش Gap-PCR:

به منظور بررسی وجود CCR5 δ 32، پرایمرها به گونه‌ای طراحی شدند که ناحیه حذف شده مورد نظر را به‌طورکامل در بر داشته باشند. بنابراین براساس اندازه قطعه مورد نظر می‌توان به وجود جهش در این ناحیه پی‌برد به گونه‌ای که پرایمرهای طراحی شده دراین مطالعه یک قطعه ۱۸۸ bp را در نوع وحشی (بدون جهش) تکثیر می‌دادند و وجود محصولPCR با اندازه ۱۵۶ bp نشان دهنده وجود δ 32 در ژن موردنظر خواهد بود. توالی پرایمرها به اینگونه بود:

F: 5'-CAAAAAGAAGGTCTTCATTACACC-3'

R: 5'-CCTGTGCCTCTTCTTCTCATTTCG-3'

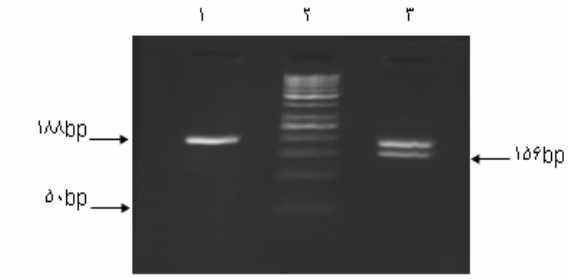
PCR در حجم ۲۵µl انجام شد که شامل این موارد بودند: ۱۰mM tris-HCL KCl، ۱/۵ mM $MgCl_2$، ژلاتین ۱ درصد، ۲۰۰ میکرومول از هر dNTP، ۰/۶ µM از هر پرایمر، ۵۰۰ نانوگرم از DNA استخراج شده به همراه آنزیم 5units recombinant Taq DNA polymerase. سیکل‌های PCR به این گونه بود: یک سیکل به صورت: $94^{o}c$ به مدت ۱ دقیقه، $58/5^{o}c$ به مدت ۴۰ ثانیه، $72^{o}c$ به مدت ۴۰ ثانیه و سپس ۳۵ سیکل به صورت: $94^{o}c$ به مدت ۴۰ ثانیه، $58/5^{o}c$ به مدت ۴۰ ثانیه، $72^{o}c$ به مدت ۴۰ ثانیه. برای الکتروفورز ابتدا یک ژل آگارز ۲ درصد به همراه اتیدیوم بروماید درست شد سپس محصول PCR به همراه bp ladder ۵۰ مورد الکتروفورز قرار گرفت. تمام مواد فوق از شرکت سیناژن تهیه شدند.

یافته ها

درطی این تحقیق، ۳۶ نفر از بیماران مبتلا به سرطان پستان و ۱۰۰ نفر از افراد سالم از نظر جهش δ 32 مورد بررسی قرار گرفتند. میانگین سن افراد در دو گروه مورد وشاهد به ترتیب ۹ ±۵۰ و ۸ ±۵۰ سال بوده است. آزمون آماری t-test هیچگونه اختلاف معنی داری را در بین دو گروه نشان نمی‌دهد (جدول شماره ۱). مضاف بر اینکه نسبت افراد دوگروه درطبقات اجتماعی موجود در جدول شماره ۱ نیز اختلاف معنی‌دار آماری نداشته است. نتایج حاصل از بررسی جهش δ 32 در دو جمعیت نشان داد که هیچکدام از بیماران داری جهش δ 32 در ژنوم خود نبودند اما سه نفر (۳ درصد) از گروه کنترل دارای هر دو فرم وحشی و δ 32 (هتروزایگوت) بودند و مابقی همگی بدون جهش بودند. با انجام آزمون‌های آماری مشخص شد که این نتایج هیچگونه اختلاف معنی‌داری را بین دو گروه نشان نمی‌دهد. نتایج حاصل از این مطالعه در جدول شماره ۲ و شکل شماره ۱ نشان داده شده است.

جدول شماره ۱: فراوانی متغیرهای سن و طبقه اجتماعی را در دو گروه مورد و شاهد

متغیر		شاهد	مورد
سن (انحراف معیار ± میانگین)		۵۰ ±۸	۵۰ ±۹
طبقه اجتماعی	ضعیف	۲۴ (۲۴٪)	۸ (۲۲/۲٪)
	متوسط	۴۴ (۴۴٪)	۱۶ (۴۴/۴۴٪)
	بالا	۳۲ (۳۲٪)	۱۲ (۳۳/۳۳٪)



شکل شماره ۱: نمونه‌ای از نتایج تکثیر ژن CCR5. ستون ۱ تکثیر ژن CCR5 بدون δ 32 را نشان می‌دهد (قطعه ۱۸۸ bp)، ستون۲ 50bp ladder و ستون۳ محصول PCR که حاوی هر دو قطعه (هتروزایگوت) ۱۸۸ bp و ۱۵۶ bp(حاوی جهش δ 32) را نشان می‌دهد.

Archive of SID
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]
www.SID.ir

بحث

مولکول CCR5 به عنوان گیرنده کموکین‌های CCL3، CCL4 و CCL5 در طی پاسخ‌های ایمنی اعمال مختلفی را انجام می‌دهند(۶،۵). به گونه‌ای که منجر به ارتشاح سلول‌های ایمنی به بافت تومور و همچنین اثر مستقیم روی خود سلول‌های سرطانی می‌شود(۵). عمده تحقیقات روی این گیرنده مربوط به‌بیماران ایدزی می‌شود، زیرا این مولکول به عنوان کمک گیرنده HIV محسوب می‌شود(۹-۷) و مطالعات نشان می‌دهدکه افرادی که دارای 32 δ در ژن CCR5 می‌باشند نسبت به افراد بدون این جهش نسبت به بیماری ایدز مقاومتر هستند و بیماری با سیری کندتر در آنها پیشرفت می‌کند(۱۲). مطالعات زیادی به بررسی ارتباط 32 δ CCR5 و بیماری‌های مختلف عفونی و غیرعفونی پرداخته‌اند، به گونه‌ای که یک مطالعه نشان داد که وجود 32 δ CCR5 با پاسخ مناسب دارویی دربیماری هپاتیتC مزمن، ارتباط دارد(۱۳) و یا مطالعه دیگری نشان داد که 32 δ CCR5 در افرادی‌که به خوبی به ویروس هپاتیتB پاسخ می‌دهند و بیماری را ریشه‌کن می‌کنند در ارتباط است(۱۴). مطالعات روی بیماران سرطانی نیز نتایج جالبی در بر داشت به گونه‌ای که سریواستاوا از کشور هند به بررسی این جهش در بیماران با سرطان مثانه پرداخت و نشان داد که این جهش با سرطان مورد مطالعه ارتباط معنادار دارد(۱۵). مطالعات روی سرطان پستان نیز نتایج مختلفی دربرداشته است به‌گونه‌ای که سانتوز نشان داد که بیماران مبتلا به سرطان پستان که دارای 32 δ CCR5 بودند، نسبت به افراد دارای فرم وحشی این ژن طول عمر کمتر داشتند و شدت بیماری در آنها بیشتر بود(۱۶). نتایج سانتوز از دو جهت قابل بحث می‌باشد اول اینکه این جهش منجر به عدم سیگنال مناسب CCR5 جهت القاء بیان p53 می‌شود و دوم اینکه نقص در این گیرنده منجر به کاهش بسیج سلول‌های ایمنی به ناحیه سلول‌های سرطانی و پاسخ ایمنی خوب به این سرطان می‌شود. از طرف دیگر مطالعه ناسی در ترکیه نشان داد که میزان 32 δ CCR5 در جامعه ترکیه ۲/۱۸ درصد می‌باشد(۱۷). این محقق به بررسی این جهش در بین بیماران با سرطان پستان، سرطان تیروئید، سرطان مغز و سرطان لارینژال پرداخت. اگر چه نتایج این محقق نشان می‌دهد که بیشترین میزان وجود 32 δ CCR5 در بیماران مبتلا به سرطان پستان می‌باشد اما این نتایج ارتباط معنی‌دار آماری بین این جهش و سرطان پستان را نشان نداد(۱۷). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که جهش 32 δ CCR5 در بیماران مبتلا به سرطان پستان واقع در شهرستان رفسنجان وجود ندارد، از طرفی تنها ۳ درصد افراد جامعه، فقط دارای فرم هتروزایگوت جهش 32 δ CCR5 بودند و حتی هیچکدام از افراد گروه کنترل دارای فرم هموزایگوت این جهش هم نبودند. بنابراین از آنجایی که میزان این جهش در جامعه ما بسیار پایین و در جامعه بیماران مورد نظر به هیچ وجه مشاهده نشد، به نظر می‌رسد که این جهش در فرایند ایجاد بیماری سرطان پستان و همچنین شدت آن در بیماران مورد بررسی شهرستان رفسنجان نمی‌تواند دخیل باشد. از طرف دیگر مطالعات مختلفی نشان می‌دهند که سلول‌های سرطانی خود اقدام به تولید CCL5 می‌کنند و از طریق CCR5 اقدام به متاستاز و حرکت منظم و برنامه‌ریزی شده سلول‌های سرطانی به نقاط مختلف بدن می‌کنند(۴). بنابراین نبود 32 δ CCR5 در بیماران ما با این نکته نیز قابل توجیه است.

References

1. Karnoub AE, Weinberg RA. Chemokine networks and breast cancer metastasis. Breast Dis 2006; 26: 75-85.

2. Andre F, Cabioglu N, Assi H, Sabourin JC, Delaloge S, Sahin A, et al. Expression of chemokine receptors predicts the site of

Archive of SID

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]

www.SID.ir

metastatic relapse in patients with axillary node positive primary breast cancer. Ann Oncol 2006; 17(6): 945-951.

3. Strieter RM, Burdick MD, Mestas J, Gomperts B, Keane MP, Belperio JA. Cancer CXC chemokine networks and tumour angiogenesis. Eur J Cancer 2006; 42(6): 768-778.
4. Vaday GG, Peehl DM, Kadam PA, Lawrence DM. Expression of CCL5 (RANTES) and CCR5 in prostate cancer. Prostate 2006; 66(2): 124-134.
5. Aldinucci D, Lorenzon D, Cattaruzza L, Pinto A, Gloghini A, Carbone A, et al. Expression of CCR5 receptors on Reed-Sternberg cells and Hodgkin lymphoma cell lines: involvement of CCL5/Rantes in tumor cell growth and microenvironmental interactions. Int J Cancer 2008; 122(4): 769-776.
6. Arababadi MK, Pourfathollah AA, Jafarzadeh A, Hassanshahi G, Mohit M, Hajghani M, et al. Evaluation of expression rate of chemokines receptor CCR5 on peripheral blood CD8+ T cells of occult hepatitis B infected patients. J Mazand Univ Med Sci 2009; 18 (68): 11-18.
7. Jin Q, Agrawal L, Meyer L, Tubiana R, Theodorou I, Alkhatib G. CCR5Delta32 59537-G/A promoter polymorphism is associated with low translational efficiency and the loss of CCR5Delta32 protective effects. J Virol 2008; 82(5): 2418-2426.
8. Singh H, Sachan R, Jain M, Mittal B. CCR5-Delta32 polymorphism and susceptibility to cervical cancer: association with early stage of cervical cancer. Oncol Res 2008; 17(2): 87-91.
9. Nahon P, Sutton A, Rufat P, Simon C, Trinchet JC, Gattegno L, et al. Chemokine system polymorphisms, survival and hepatocellular carcinoma occurrence in patients with hepatitis C virus-related cirrhosis. World J Gastroenterol 2008; 14(5): 713-719.
10. Arababadi MK, Naghavi N, Hassanshahi G, Mahmoodi M. CCR5 Δ 32 mutation is associated with nephropathies of type 2 diabetes?. Ann Saud med, article in press.
11. Spector D, Mishel M, Skinner CS, Deroo LA, Vanriper M, Sandler DP. Breast Cancer Risk Perception and Lifestyle Behaviors Among White and Black Women With a Family History of the Disease. Cancer Nurs 2009; 13: 13.
12. Oh DY, Jessen H, Kucherer C, Neumann K, Oh N, Poggensee G, et al. CCR5Delta32 genotypes in a German HIV-1 seroconverter cohort and report of HIV-1 infection in a CCR5Delta32 homozygous individual. PLoS ONE 2008; 3(7): e2747.
13. Mangia A, Santoro R, D'Agruma L, Andriulli A. HCV chronic infection and CCR5-delta32/ delta32. Gastroenterology 2003; 124(3): 868-869; author reply 69-70.
14. Thio CL, Astemborski J, Bashirova A, Mosbruger T, Greer S, Witt MD, et al. Genetic protection against hepatitis B virus conferred by CCR5Delta32: Evidence that CCR5 contributes to viral persistence. J Virol 2007; 81(2): 441-445.
15. Srivastava A, Pandey SN, Choudhuri G, Mittal B. CCR5 Delta32 polymorphism: associated with gallbladder cancer susceptibility. Scand J Immunol 2008; 67(5): 516-522.
16. Manes S, Mira E, Colomer R, Montero S, Real LM, Gomez-Mouton C, et al. CCR5 expression influences the progression of human breast cancer in a p53-dependent manner. J Exp Med 2003; 198(9): 1381-1389.
17. Degerli N, Yilmaz E, Bardakci F. The delta32 allele distribution of the CCR5 gene and its relationship with certain cancers in a Turkish population. Clin Biochem 2005; 38(3): 248-252.

Archive of SID

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]

www.SID.ir